



**OPTIMALISASI AGAR COKLAT DARAH MANUSIA
SEBAGAI MEDIA UJI SENSITIVITAS ANTIBIOTIK
TERHADAP *Haemophilus influenzae*:
PERAN *PACKED RED CELL***

**JURNAL MEDIA MEDIKA MUDA
KARYA TULIS ILMIAH**

**Diajukan sebagai syarat untuk mengikuti ujian hasil Karya Tulis Ilmiah
mahasiswa Program Strata-1 Kedokteran Umum**

ANISA RIZKA

G2A008025

**PROGRAM PENDIDIKAN SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO**

2012

LEMBAR PENGESAHAN LAPORAN HASIL KTI

**OPTIMALISASI AGAR COKLAT DARAH MANUSIA
SEBAGAI MEDIA UJI SENSITIVITAS ANTIBIOTIK
TERHADAP *Haemophilus influenzae*:
PERAN *PACKED RED CELL***

Disusun oleh :

ANISA RIZKA

G2A008025

Telah disetujui :

Semarang, 8 Agustus 2012

Dosen Pembimbing

Penguji

dr. Helmia Farida, M. Kes, Sp.A
19661213 200112 2 001

dr. Endang Sri Lestari, Ph.D
19661016199702 2 001

Ketua Penguji

dr. Subakir, Sp.MK, Sp.KK(K)

Optimalisasi Agar Coklat Darah Manusia Sebagai Media Uji Sensitivitas Antibiotik terhadap *Haemophilus influenzae*: Peran *Packed Red Cell*

Anisa Rizka* Helmia Farida**

ABSTRACT

Optimizing human blood derived chocolate agar as a medium of antimicrobial susceptibility test of Haemophilus influenzae: role of packed red cell

Background: The standard medium for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* is *Haemophilus Test Medium (HTM)*. It is difficult to provide and expensive, causing standard routine test for *Haemophilus influenzae* is very rarely done. In Indonesia the use of human blood as a medium for antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* has not been done.

Aim: To compare the agreement of the results of antimicrobial susceptibility testing of *H.influenzae* in ACD, ACMSt, and ACMH, with HTM to find an alternative medium for antimicrobial susceptibility testing of *H.influenzae* as HTM

Methods: The design study used a True experimental post-test only. Antimicrobial susceptibility test was carried on by disc diffusion method (CLSI 2011) on HTM, ACD, ACMSt, ACMH against 11 strains of *H.influenzae*. Data were analyzed by Kappa agreement test with the minimum agreement $k > 0.80$ (very good agreement).

Results: For ACD, $k > 0.80$ were only achieved by 40% antibiotic tested (chloramphenicol and cotrimoxazole). For ACMSt, very good agreement was achieved only by 60% antibiotic tested (chloramphenicol, cotrimoxazole, and tetracycline). For ACMH, very good agreement was achieved by all(100%) of the antibiotics tested (chloramphenicol, co-trimoxazole, tetracycline, amoxicillin-clavulanic acid, and ceftriaxone).

Conclusion: ACMH could be used as an alternative medium for antimicrobial susceptibility testing of *H.influenzae*.

Keywords: *Haemophilus influenzae*, hemoglobin, chocolate agar, human blood, antimicrobial susceptibility testing

*Mahasiswa Studi S1 Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

**Staf Pengajar Bagian Mikrobiologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

ABSTRAK

Latar Belakang: Media standar untuk uji sensitivitas antibiotik terhadap *Haemophilus influenzae* adalah *Haemophilus Test Medium* (HTM). Pengadaannya yang sulit dan mahal membuat uji standar rutin untuk *Haemophilus influenzae* jarang dilakukan. Di Indonesia penggunaan darah manusia sebagai media uji sensitivitas antibiotik terhadap *Haemophilus influenzae* belum pernah dilakukan sebelumnya.

Tujuan: Membandingkan kesesuaian hasil uji sensitivitas antibiotik terhadap *H.influenzae* pada media ACD,ACMSt, dan ACMH, dengan HTM untuk mendapatkan alternatif media uji sensitivitas antibiotik terhadap *H.influenzae* sebaik HTM

Metode: Penelitian ini menggunakan desain *True experimental post test only*. Uji sensitivitas antibiotik dengan metode difusi cakram (CLSI 2011) pada media HTM,ACD,ACMSt,ACMH terhadap 11 strain *H.influenzae*. Analisis data menggunakan uji statistik Kappa dengan nilai kesesuaian minimum $k > 0,80$ (kesesuaian sangat baik).

Hasil: Pada media ACD, $k > 0,80$ hanya dicapai oleh 40% antibiotik yang diuji (kloramfenikol dan kotrimoksazol). Pada media ACMSt, kesesuaian sangat baik hanya dicapai oleh 60% antibiotik yang diuji (kloramfenikol, kotrimoksazol, dan tetrasiklin). Pada media ACMH, kesesuaian sangat baik dicapai oleh semua (100%) antibiotik yang diuji (kloramfenikol, kotrimoksazol, tetrasiklin, amoksisilin-asam klavulanat, dan seftriakson).

Kesimpulan: ACMH dapat dijadikan sebagai media alternatif untuk uji sensitivitas antibiotik terhadap *H.influenzae*.

PENDAHULUAN

Haemophilus influenzae adalah bakteri gram negatif, kokobasil, kecil, tidak membentuk spora, dan pleomorfik.^{1,2} Angka kesakitan penyakit-penyakit yang disebabkan oleh *H.influenzae* di Indonesia masih tinggi. Menurut Riskedas 2007, pneumonia merupakan penyakit penyebab kematian kedua tertinggi setelah diare di antara balita, dan *H.influenzae* merupakan penyebab tersering kedua dari penyakit ini.³ Penyakit lain yang sering disebabkan oleh *H.influenzae* dan memiliki angka kesakitan dan kematian yang tinggi adalah meningitis.^{4,5}

Haemophilus Test Medium (HTM) adalah media standar untuk melakukan uji sensitivitas terhadap *H.influenzae*. Komposisi dari *Haemophilus Test Medium* adalah Mueller Hinton Agar yang ditambahkan faktor X dan faktor V, serta ekstrak *yeast*.⁶ Harganya yang mahal dan tidak tersedianya media tersebut di Indonesia membuat uji sensitivitas untuk *H.influenzae* jarang dilakukan. Resistensi antibiotik masih menjadi masalah terdepan dalam pengobatan modern. Uji sensitivitas rutin dengan media yang tepat, penting untuk mengatasi masalah resistensi ini, termasuk resistensi *H.influenzae* terhadap antibiotik. Pengadaan media uji sensitivitas yang mudah serta biaya yang murah mutlak menjadi syarat untuk dapat dilakukannya uji sensitivitas secara rutin.

Pada penelitian ini digunakan darah manusia sebagai penyedia faktor X dan V, di mana darah manusia merupakan darah yang mudah pengadaanya dan harganya murah. Namun, darah manusia memiliki banyak faktor inhibisi yang akan merusak faktor X dan V pada pemanasannya sehingga *H.influenzae* tidak dapat tumbuh dengan baik bila dibandingkan dengan media dengan darah domba. Penelitian yang dilakukan oleh Risang B. tahun 2011, menunjukkan bahwa agar coklat dari darah manusia yang ditingkatkan kadar hemoglobinnya (menggunakan *packed red cell*) dapat menumbuhkan *H.influenzae* sebaik agar coklat dari darah domba.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dilakukan penelitian mengenai optimalisasi agar coklat darah manusia yang dimodifikasi dengan menggunakan *packed red cell* sebagai media uji sensitivitas antibiotik terhadap *H.influenzae*. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kesesuaian antara media modifikasi dengan media standar HTM dengan harapan penelitian ini dapat dijadikan inovasi atau alternatif baru, terutama dalam bidang kedokteran.

METODE

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan desain *True-experimental post test only*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi FK UNDIP pada bulan Maret-Mei 2012. Sampel pada penelitian ini adalah strain *H. influenzae* ATCC 49247 dan strain isolat swab nasofaring orang sehat RSUP dr.Kariadi Semarang yang tumbuh pada media HTM, agar coklat dari darah domba, dan agar coklat dari darah manusia. Sampel dieksklusi apabila terdapat kontaminasi pada media HTM, agar coklat dari darah domba, dan agar coklat dari darah manusia.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah media uji sensitivitas antibiotik terhadap *H.influenzae* antara lain HTM, agar coklat darah domba (ACD), agar coklat darah manusia dengan Hb standar (ACMSt), dan agar coklat darah manusia dengan *packed red cell* (ACMH). Variabel tergantungnya adalah hasil uji sensitivitas 5 macam antibiotik yaitu amoksisilin asam-klavulanat 20/10µg, seftriakson 30µg, kloramfenikol 30µg, kotrimoksazol(trimetoprim-sulfametoksazol 1,25/23,75 µg), dan tetrasiklin 30µg terhadap *H.influenzae* yang dibagi menjadi sensitif dan resisten(resisten dan intermediate).

Alur dalam penelitian ini adalah menumbuhkan *H.influenzae* strain ATCC 49247 dan strain dari isolat klinik RSUP dr.Kariadi Semarang. Kemudian dilakukan pembuatan media HTM, ACD, ACMSt, dan ACMH. Kuman yang telah diinkubasi selama 24 jam kemudian diinokulasikan pada media HTM, ACD, ACMSt, dan ACMH dan ditemplei cakram antibiotik amoksisilin asam-klavulanat, seftriakson, kloramfenikol, kotrimoksazol, dan tetrasiklin.

Kemudian semua media diletakkan dalam sungkup lilin lalu diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 35°C selama 18-24 jam. Diameter zona inhibisi pada media ACD, ACMSt, dan ACMH yang terlihat diukur kemudian diinterpretasikan dan dibandingkan dengan zona inhibisi pada media HTM. Hasil pengamatan pada variabel tergantung dianalisis dengan menggunakan uji statistik Kappa dengan nilai kappa standar untuk dunia kedokteran adalah $\geq 0,80$ (kesesuaian sangat baik)⁷.

HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL

Dalam penelitian ini digunakan sebelas sampel yang telah diisolasi dan ditanam pada media HTM, ACD, ACMSt, dan ACMH. Jumlah sampel yang digunakan telah memenuhi syarat replikasi minimal untuk tiap perlakuan sesuai dengan rumus Freederer yaitu tujuh sampel. Setiap replikasi diulang secara diplo. Kesebelas sampel kuman *H.influenzae* terdiri dari satu strain ATCC (*American Type Culture Collection*) 49247 dan sepuluh strain dari isolat murni *H.influenzae* dari swab nasofaring individu sehat klinik RSUP dr. Kariadi Semarang. Sampel yang digunakan berupa sampel segar yang berumur 18-24 jam.

Hasil uji sensitivitas antibiotik terhadap *H.influenzae* berupa diameter zona inhibisi yang akan diinterpretasikan dan dibandingkan dengan diameter zona inhibisi standar yang ditetapkan oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) kemudian diinterpretasikan. Uji hipotesis menggunakan uji kesesuaian *Kappa* untuk menentukan kesesuaian antara media modifikasi dengan media standar (HTM).

Tabel 1. Data interpretasi diameter zona inhibisi antibiotik pada media HTM, ACD, ACMSt, dan ACMH

Jenis Antibiotik	Interpretasi diameter zona inhibisi antibiotik berdasarkan CLSI							
	HTM		ACD		ACMSt		ACMH	
	S	R	S	R	S	R	S	R
1) Amoksisilin asam-klavulanat 20/10µg	19	3	17	5	17	5	19	3
2) Seftriakson 30 µg	19	3	17	5	20	2	19	3
3) Kloramfenikol 30 µg	18	4	19	3	18	4	18	4
4) Kotrimoksazol (trimetoprim-sulfametoksazol 1,25/23,75 µg	21	1	21	1	21	1	21	1
5) Tetrasiklin 30 µg	15	7	7	15	13	9	13	9

Keterangan: S: Sensitif
R: Resisten dan intermediate

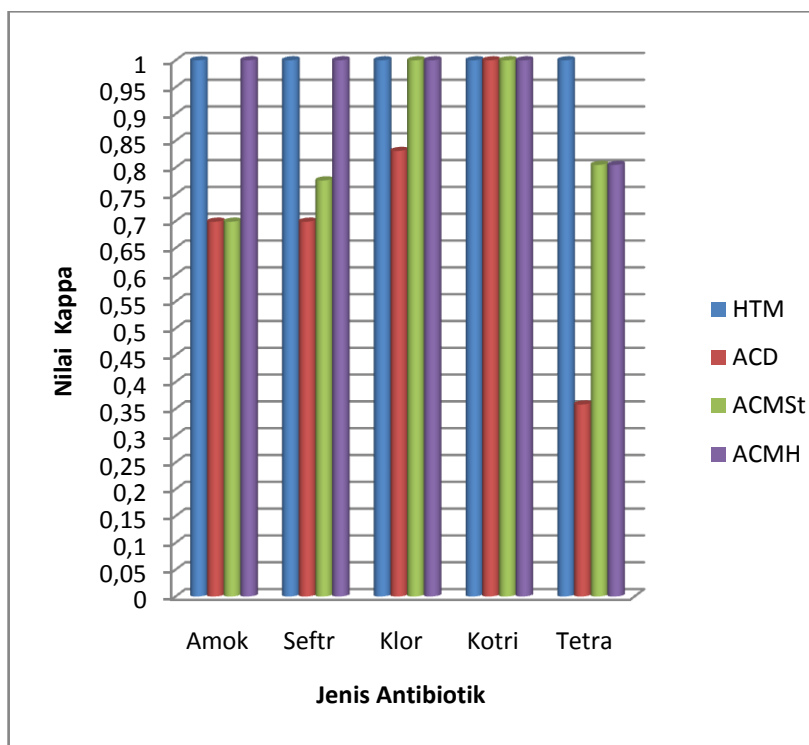
Tabel 2. Tabel besar nilai *Kappa*

Nilai <i>Kappa</i>	<i>Strength of agreement</i>	
< 0,20	<i>Poor</i>	(slight agreement)
0,21 – 0,41	<i>Fair</i>	(fair agreement)
0,41 – 0,60	<i>Moderate</i>	(moderate agreement)
0,61 – 0,80	<i>Good</i>	(substantial agreement)
0,81 – 0,99	<i>Very good</i>	(almost perfect agreement)

Dalam penelitian ini *agreement* atau kesesuaian nilai uji statistik *Kappa* menunjukkan tingkat kesesuaian serta ketepatan atau presisi media modifikasi sebagai media uji sensitivitas antibiotik terhadap *H.influenzae*.

Dalam bidang kedokteran, nilai *Kappa* dari hasil penelitian dapat dikatakan layak apabila mencapai nilai di atas 0,80 (sangat baik).⁷ Semakin tinggi nilai *Kappa* pada media modifikasi maka semakin sesuai media tersebut dengan media standar uji sensitivitas (HTM)

Gambar 1. Grafik nilai *Kappa* berbagai media uji sensitivitas antibiotik terhadap *H.influenzae*



Keterangan: Amok : Amoksisilin-asam klavulanat 20/10 µg
 Seftir : Seftriakson 30 µg
 Klor : Kloramfenikol 30 µg
 Kotri : Kotrimoksazol (Trimetoprim-sulfametoksazol) 1,25/23,75 µg
 Tetra : Tetrasiklin 30 µg

Berdasarkan grafik di atas (lihat gambar 1) mengenai uji kesesuaian *Kappa* antara media modifikasi dengan media standar, didapatkan hasil bahwa media ACD memiliki kesesuaian sangat baik (nilai *Kappa* >0,80) dengan HTM hanya terdapat pada dua antibiotik (40%), yaitu untuk antibiotik kloramfenikol dan kotrimoksazol, sedangkan pada media ACMSt hanya terdapat pada tiga antibiotik (60%), yaitu kloramfenikol, kotrimoksazol, dan tetrasiklin, serta media ACMH terdapat pada semua antibiotik yang ditanam (100%) yaitu amoksisilin asam klavulanat, seftriakson, kloramfenikol, kotrimoksazol, dan tetrasiklin.

PEMBAHASAN

Pada uji sensitivitas antibiotik dengan metode difusi terdapat beberapa faktor teknis yang mempengaruhi ukuran diameter zona inhibisi, antara lain kepekatan inokulum, waktu pemasangan cakram, suhu inkubasi, waktu inkubasi, ketebalan media, pengaturan jarak cakram antibiotik, kecepatan difusi antibiotik, derajat sensitifitas mikroorganisme, dan kecepatan pertumbuhan bakteri, dan komposisi media.⁸

Pada penelitian ini telah dikontrol semua faktor yang disebutkan di atas supaya sama kecuali komposisi media yang memang dibuat berbeda. Apabila terdapat perbedaan pada salah satu faktor akan mempengaruhi hasilnya karena akan memperbesar atau memperkecil ukuran diameter zona inhibisinya. Karena adanya perbedaan dari komposisi medianya maka hasil yang didapat bisa berbeda dari nilai kesesuaian dari media standar (HTM) dengan media modifikasi.

ACD merupakan media uji sensitivitas antibiotik terhadap *H.influenzae* yang memiliki kecukupan nutrisi untuk menunjang pertumbuhan bakteri sehingga pada pertumbuhan serta metabolisme bakteri tetap optimal, namun pada media ini kepadatannya meningkat karena terdapat penambahan darah domba sehingga kemungkinan terjadi penurunan kecepatan difusi antibiotik ke dalam media. Akibatnya zona inhibisi pada ACD yang terbentuk lebih kecil daripada zona inhibisi pada HTM, menyebabkan nilai Kappa yang didapatkan kurang dari standar.

ACMSt merupakan media dengan Hb standar dan terdapat faktor inhibisi yang menghambat pertumbuhan bakteri. Kepadatan media ini juga bertambah karena ada penambahan darah manusia pada Mueller hinton agar yang menyebabkan penurunan pada kecepatan difusi antibiotik. Akibatnya zona inhibisi pada media ini lebih kecil daripada pada media HTM.

ACMH merupakan media yang menggunakan *packed red cell*. Penggunaan jenis darah ini diharapkan menambah faktor X(hemin) sebagai penyedia nutrisi. Penambahan nutrisi ini menyebabkan bakteri dapat tumbuh dengan optimal. Kepadatan media ini bertambah, namun dari hasil penelitian menunjukkan kesesuaian yang sangat baik pada semua antibiotik yang diuji sehingga kepadatan media tidak menurunkan kecepatan difusi antibiotik pada media ini. Hal ini kemungkinan karena hal-hal yang mempengaruhi kecepatan difusi antibiotik adalah derajat kelarutan lemak dan ikatan protein.⁹ Pada membran eritrosit terdapat senyawa berupa lemak yaitu sfingomyelin. Pada hemoglobin terdapat globin sebagai senyawa protein. Pada darah manusia terdapat senyawa lemak dan protein yang berbeda dengan darah domba.

Darah manusia yang didapatkan pada bank darah dapat diperoleh dengan mudah dan tanpa mengeluarkan uang, sehingga pembuatan media ACMH lebih murah daripada ACD dan HTM. Dengan terpenuhinya syarat kesesuaian minimum ($k > 0,8$) maka ACMH memiliki keandalan yang cukup dan harganya ekonomis, sehingga dapat dijadikan sebagai alternatif media uji sensitivitas antibiotik terhadap *H.influenzae*.

SIMPULAN

Media ACD dan ACMSt belum memiliki keandalan yang cukup sehingga belum layak dijadikan alternatif media uji sensitivitas antibiotik terhadap *Haemophilus influenza*. Media ACMH memiliki keandalan yang cukup dan harganya ekonomis, sehingga dapat digunakan sebagai media alternatif untuk uji sensitivitas antibiotik terhadap *Haemophilus influenza*.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap jenis antibiotik yang lain agar media ini dapat dijadikan sebagai media alternatif uji sensitivitas antibiotik semua jenis dan dapat diproduksi secara komersial.

Karena kemudahan dalam pengadaan bahan serta pembuatan media ACMH sebagai media alternatif uji sensitivitas, diharapkan uji standar rutin terhadap *Haemophilus influenza* dapat dilakukan di laboratorium dengan keterbatasan sumber dana, mengingat *Haemophilus influenza* merupakan patogen yang penting.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, atas segala nikmat dan rahmatNya. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementrian Pendidikan Nasional Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi yang telah mendanai penelitian ini melalui lomba PKMP DIKTI, dr. Helmia Farida, M.Kes, Sp.A selaku dosen pembimbing atas saran dan bimbingannya. Kepada dr. Endang Sri Lestari, PhD selaku penguji dan dr. Subakir, Sp.MK, Sp.KK(K) selaku ketua penguji. Serta tidak lupa kepada orangtua, keluarga, teman-teman, serta pihak-pihak yang telah mendoakan dan membantu selama pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jawetz, Melnik, Adelberg. Mikrobiologi Kedokteran Edisi 23. Jakarta: EGC; 2007.
2. Mark A. Herbert, E. Richard Moxon, Derek W. Hood. editor. Method in molecular medicine: *Haemophilus influenzae* protocol; 71(2)
3. Kementrian Kesehatan RI. Jakarta (Indonesia) : Jendela Epidemiologi 2010
4. Mansjoer, Arif, dkk. Kapita Selekta Kedokteran, Edisi Jilid II. Jakarta: Media Aeskulapius FKUI; 2000
5. World Health Organization. Estimated Hib and pneumococcal deaths for children under 5 years of age[Internet]. c2012[updated 2011 Feb 7;cited 2012 Feb 4]. Available from:
http://www.who.int/immunization_monitoring/burden/Pneumo_hib_estimates/en/index1.html
6. James H Jorgensen, Judith S. Redding. Louise A Maher, dan Anne W. Howell. Improved Medium for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Haemophilus influenza*; 1987.

7. Cohen J. Weighted Kappa: *Nominal Scale Agreement with Provision for Scaled Dissagreement or Partial Credit*. Psychological Bulletin.70: 213-20. 1968
8. J. Vandepitte, J. Verhaegen, et al. *Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology*, Ed.2. Jakarta:EGC; 2010.
9. Syarif Amir, Estuningtyas.Ari, dkk. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Jakarta: Balai penerbit FK UI.2009